

氏 名	中 西 猛 夫
生 年 月 日	
本 籍	奈良県
学 位 の 種 類	博士（薬学）
学 位 記 番 号	博甲第296号
学位授与の日付	平成11年3月25日
学位授与の要件	課程博士（学位規則第4条第1項）
学位授与の題目	Functional Characterization of Oligopeptide Transporter, PepT1, and Tissue-Selective Drug Delivery Utilizing Oligopeptide Transport System（オリゴペプチドトランスポーターPepT1の機能解析とオリゴペプチド輸送系を利用した組織選択的薬物デリバリー）
論 文 審 査 委 員	（ 主 査 ） 辻 彰 （ 副 査 ） 宮本 謙一, 玉井 郁巳, 横井 毅, 佐々木琢磨

学 位 論 文 要 旨

[Abstract]

Oligopeptide transporter, PepT1, plays a crucial role in intestinal absorption and renal reabsorption of peptide-mimetic drugs as well as endogenous di- and tripeptide. The purpose of this thesis was to explore a tissue-selective drug delivery, utilizing oligopeptide transporter, PepT1 in the small intestine and oligopeptide transport system in cancer cells. Firstly, the functions of PepT1 in small intestine were characterized. Immunohistochemistry using anti PepT1 antibody and functional characterization using *Xenopus* oocytes expressed PepT1 demonstrated that PepT1 localizes only at the brush-border membrane of the intestinal epithelial cells and that it contributes to the intestinal absorption of peptide-mimetic drugs such as β -lactam antibiotics and non-peptide drugs such as valacyclovir. Secondary, the possibility of tissue-selective drug delivery utilizing PepT1 and oligopeptide transport system in cancer cells was examined. By dipeptide-derivation of L-dopa, which is absorbed poorly, to be recognized by PepT1, improvement of its intestinal absorption was expected. I found an existence of the specialized transport system for oligopeptides in several cancer cells, but not in normal cells. By utilizing difference in expression level of oligopeptide transporter between tumor and normal tissue, the possibility to deliver selectively peptide-mimetic drug to tumor was strongly indicated. In conclusion, present results provide the novel idea that tissue-selective drug delivery is possible by utilizing membrane transporter, based on functional characterization.

生体を構成している組織・臓器の細胞膜は、生命を維持するために必要な栄養物や生理活性物質を生体膜輸送担体（トランスポーター）を介して選択的に取り入れ、また生体外異物を排出するなど、物質の細胞内への移行を取捨選択するインターフェイスとして機能している。生体膜トランスポーターが本来輸送すべき基質と構造が類似する物質を認識・輸送すれば、薬物の吸収・組織移行性の増大に、あるいは排出を利用した組織移行性回避に利用できる可能性がある。

小腸上皮および腎臓尿細管上皮細胞の刷子縁膜に存在するオリゴペプチドトランスポーターPepT1はジおよびトリペプチドの（再）吸収に重要な役割を担っている。これまでの研究により、PepT1は天然のペプチド以外にも、 β -ラクタム抗生物質、ACE阻害剤、抗腫瘍剤であるベスタチンなどのペプチド類似薬物を認識する幅広い基質認識を持つトランスポーターとして機能していることが知られている。PepT1は1994年、ウサギ小腸よりクローニングされた。引き続いて、そのファミリーとしてPepT2がクローニングされた。我々の研究室では、ラット小腸よりPepT1をクローニングし、その機能解析、分子機構に関する研究を行ってきた。PepT1が、細胞膜上に発現し細胞外から細胞内への物質の輸送に関与していると考えられる組織は小腸および腎のみである。また、PepT2は、主に腎尿細管上皮刷子縁膜と脳に多く発現している。PepT1、2以外にも、オリゴペプチドトランスポーターとして、1997年、オリゴペプチド以外にヒスチジンを特異的に認識するトランスポーターとして、PHTがクローニングされた。PHTは、主に脳に発現していることが知られている。このように、オリゴペプチドトランスポーターの発現組織は極めて限定されているようである。

一方、癌細胞は、その旺盛な増殖能を維持するために、多くの内因性物質を能動的に取り込むことが知られているが、オリゴペプチド輸送活性については、ほとんど知見が得られていなかった。そこで、癌細胞においてオリゴペプチド輸送活性が確かめられれば、オリゴペプチドトランスポーターの限定された組織分布を利用して、ペプチド類似薬物を腫瘍組織へターゲティングさせることができないか、という斬新な発想のもとに、癌細胞におけるオリゴペプチド輸送活性に着目した。

本研究では、まずはじめに、幅広い基質認識性と限局された組織分布を示すオリゴペプチドトランスポーターを利用して、ペプチド類似薬物の消化管吸収性の向上と組織移行性を制御するために、PepT1の小腸における発現と輸送認識特性を中心とした詳細な機能解析を行った。次に、オリゴペプチド輸送系を用いた組織選択的薬物デリバリーの可能性について検討した。

【結果及び考察】1 *PepT1*の機能解析 これまでの研究成果により、オリゴペプチドトランスポーター*PepT1*は、小腸上皮細胞に存在し、ジ、トリペプチドおよび様々なβ-ラクタム抗生物質を認識することが示されてきた。しかし、モノあるいはジアニオン型のβ-ラクタム抗生物質の輸送に関しては、*PepT1*以外の輸送系の関与も示唆されていた。また、小腸灌流実験によりペプチド結合を分子内に持たないバラシクロビル（抗ウィルス薬）の様な化合物さえも、認識される可能性が示されていた。

本研究では、まず、抗ウサギ*PepT1*抗体を作製しウサギ小腸組織切片を用いることにより、免疫組織学的に*PepT1*が小腸上皮細胞刷子縁膜に存在することを確認した。*PepT1*の基質認識性を検討するために、ラット*PepT1*cDNA（rat*PepT1* cDNA）からcRNAを作製し外来遺伝子発現系である アフリカツメガエル卵母に発現させ、様々なβ-ラクタム抗生物質を用いてその基質特異性を明らかにした。*PepT1*発現卵母細胞による様々なβ-ラクタム抗生物質の取り込みは、典型的な基質である $[^{14}\text{C}]\text{Gly-Sar}$ と同様に、対照群と比較して有意に増加した。これらの薬物の消化管吸収に対して*PepT1*がどの程度寄与しているかを、*PepT1*の発現領域に対するアンチセンスDNAを用いたhybrid depletion法により検討した。ラットおよびウサギ小腸由来のpoly(A)⁺RNAを予めアンチセンスDNAとハイブリダイズさせてから卵母細胞に発現させた場合、 $[^{14}\text{C}]\text{Gly-Sar}$ 、cefadroxil（アミノ-β-ラクタム抗生物質）およびceftibuten（ジアニオン型β-ラクタム抗生物質）の取り込み活性は、ほぼ対照群と同程度まで減少することが明らかになった。これらの結果から、*PepT1*は小腸において天然のペプチドと同様に、ペプチド類似薬物であるβ-ラクタムのトランスポーターを介した消化管吸収においてほぼ支配的な役割を果たしていることが実証された。さらに、アシクロビル（抗ウィルス薬）のバリンエステル誘導体であるバラシクロビルのように、ペプチド結合を分子内に持たない薬物と*PepT1*との相互作用を検討することは、*PepT1*の基質認識性に新しい知見を与えると同時に、経口剤の分子設計に重要な知見を与えることが期待できた。そこで、ヒト*PepT1*（h*PepT1*）発現卵母細胞を用い、バラシクロビルのh*PepT1*による輸送特性を解析した。h*PepT1*によるバラシクロビルの輸送には、濃度依存性（ $K_m = 5.94 \pm 1.91 \text{ mM}$ and $V_{max} = 1.68 \pm 0.25 \text{ nmol/hr/oocyte}$ ）、酸性条件下で高い輸送活性を示すpH依存性が観察された。また、その取り込みは、*PepT1*の基質で阻害されたが、アシクロビルやバリンによっては影響を受けなかった。これらの結果は、ペプチド結合を持たない化合物についても*PepT1*の基質として認識・輸送されることを示す初めての知見である。

以上、*PepT1*は小腸上皮に存在し、幅広く薬物を認識するだけでなく、その消化管吸

収に対して支配的な寄与を示すことが明らかになった。このような、特徴あるオリゴペプチドトランスポーターを利用することによって、薬物の消化管吸収の向上と組織選択的薬物デリバリーの可能性について検討した。

2 PepT1およびオリゴペプチド輸送系を利用した組織選択的薬物デリバリー

本研究では、吸収に優れないアミノ酸類似薬物のジペプチド化により、PepT1をターゲットにした薬物の吸収改善を試みた。パーキンソン病の最も有効な治療薬であるL-dopaを用いて、そのプロドラッグとして合成されたL-dopa-L-PheがhPepT1に認識・輸送されることをhPepT1発現卵母細胞を用いて直接的に証明した。さらに、ヒト消化管での吸収性を評価するために、ヒト小腸上皮細胞モデルであるCaco-2細胞を用いてその透過性を検討した。L-dopa-L-PheをCaco-2細胞の単層膜のapical側に投与した場合、L-dopaと比較して、L-dopaおよびその代謝物であるdopamineのbasolateral側への透過量は有意に増加した。また、この透過量は、Gly-Sar存在下で著しく減少した。これらの結果は、ジペプチド誘導化によって、PepT1をターゲットにした薬物の消化管吸収改善の可能性を強く示すものと考えられた。

さらに、薬物デリバリーの全く新しい概念として、幅広い基質認識性と限られた組織分布を示すオリゴペプチド輸送系の組織による発現量の違いを利用した薬物デリバリーの可能性について検討した。まず、このデリバリーの可能性を示すために、hPepT1安定発現株 HeLa-hPepT1を構築し、ヌードマウスにこの細胞株を移植し腫瘍を形成させ、体内で比較的安定な $[^3\text{H}]$ carnosine (β -Ala-His)の腫瘍移行性を測定した。 $[^3\text{H}]$ Carnosineの腫瘍移行性は組織-血漿間分配係数 (K_p 値)で解析した。CarnosineのhPepT1を過剰発現した腫瘍組織への K_p 値は、hPepT1を発現しないHeLa細胞を用いて腫瘍を形成させた場合と比較して約4倍、オリゴペプチド輸送活性を持たない筋肉への移行性と比較して約7倍、さらに細胞間隙マーカーである $[^{14}\text{C}]$ イヌリンの腫瘍移行性と比較して約5倍、という顕著な増加を示した。このジペプチドの腫瘍移行性増大は、組織依存的な発現を示すオリゴペプチド輸送系を利用した薬物デリバリーの可能性を実験的に証明する結果と考えられた。この仮説に基づき、実際の腫瘍へのペプチド類似薬物の組織移行性の増大を目的として、様々な癌細胞においてオリゴペプチド輸送活性を検討した。まず、ヒト繊維肉腫、HT-1080細胞で、 $[^{14}\text{C}]$ Gly-Sarの取り込みを検討した。HT-1080細胞による $[^{14}\text{C}]$ Gly-Sarの取り込みには、温度依存性、濃度依存性 ($K_m = 11.4 \pm 3.3 \text{ mM}$ and $V_{\max} = 26.8 \pm 4.0 \text{ nmol/15min/mg protein}$)、pH依存性、および様々なジおよびトリペプチドによる阻害効果が観察され、既知のPepT1に類似するものの完全に一致しない、新しいオリ

ゴペプチド輸送系の関与が示された。しかし、正常繊維芽細胞であるIMR-90では、 $[^{14}\text{C}]\text{Gly-Sar}$ の取り込みにはこのようなトランスポーターの関与は見いだされなかった。HT-1080細胞以外にも、T24、SW684、およびSK-Hep1細胞などでもこのようなオリゴペプチド輸送活性が観察されたが、全ての癌細胞に見られる共通の性質でないことも明らかになった。また、RT-PCRの結果、これらいずれの癌細胞においても、PepT1およびPepT2の発現が認められず、既知のトランスポーターの関与の可能性は小さいと考えられた。オリゴペプチドトランスポーターの発現を利用した薬物デリバリーを実際に行うために、生理的に活性を持つ癌細胞の存在を示唆したことは、非常に重要な意義があると考えられた。そこで、HT-1080細胞をヌードマウスへ移植して形成させられた腫瘍への $[^3\text{H}]\text{carnosine}$ の移行性を測定し、対照として筋肉への移行性と比較した。 $[^3\text{H}]\text{Carnosine}$ の腫瘍におけるKp値は、筋肉と比較して約2倍、イヌリンの腫瘍への移行性と比較しても約2-3倍増加した。さらに、腫瘍組織切片による $[^3\text{H}]\text{carnosine}$ の取り込みは、非標識 carnosine 存在下で有意に減少した。これらの結果は、癌細胞に備わる性質を利用すれば、腫瘍組織へのペプチド類似薬物の移行性を増大させることが可能であることを示している。このような癌細胞に見られるオリゴペプチド輸送活性の生理的役割については現在のところ不明である。今後、薬物デリバリーの有用性を論じるためだけでなく、癌細胞の生命維持機構を理解するためにも、癌細胞でのオリゴペプチド輸送活性のメカニズムを解明することは重要であると考えられる。

【結論】 本研究は、これまでの過去の知識の集積に基づき、PepT1が小腸上皮細胞刷子縁膜に存在し、天然のペプチドと同様にペプチド類似薬物である β -ラクタム抗生物質の消化管からの吸収に支配的な役割を果たしていることを実証した。さらに、パラシクロピルのPepT1による輸送が確認できたことは、PepT1の基質認識にはペプチド結合が必須でないことを証明するものであり、今後、経口剤の分子設計に重要な知見を与えると考えられた。また、特徴ある生体膜輸送系を有効に利用することにより、難吸収性薬物の消化管吸収の改善と腫瘍組織をターゲットとした薬物の組織選択的な移行性制御の可能性を示唆できたことは、新しい薬物デリバリーシステムの構築が可能であることを強く示すものである。また、複数の癌細胞にみられたオリゴペプチド輸送活性は、薬物デリバリーだけでなく、旺盛に増殖する癌細胞のメカニズム解明にも新しい知見を与えることが期待される。今後、分子レベルでの実体の解明が、必要不可欠である。最後に、本研究は、詳細な生体膜輸送研究に基づき、積極的にそれを応用した薬物デリバリーの可能性を実験的に、かつ応用的に示した点で、薬物の体内動態制御に極めて新しい概

念を提示するものであると考える。

学位論文審査結果の要旨

当該論文に対する個別審査後、平成 11 年 2 月 2 日の口頭発表における質疑応答の結果を踏まえ、協議の結果、次の通り判定した。

本研究は、ラット及びヒト小腸からクローニングされたオリゴペプチドトランスポーター PepT 1 遺伝子発現系を用いて、PepT 1 の薬物構造認識・輸送に関して以下に列挙する新規な知見を得ると同時に、オリゴペプチドトランスポーターの限定された組織分布特性を利用した組織選択的ドラッグデリバリー戦略に新しい道を開いた。

- ① 新たに作成した抗 PepT 1 抗体による免疫組織染色によって、PepT 1 は小腸刷子縁膜上にのみ発現し、結腸には発現していないことを明らかとした。
- ② PepT 1 発現アフリカツメガエル卵母細胞を用いて、様々な β -ラクタム抗生物質、ACE 阻害剤、パラシクロビルが天然のオリゴペプチドと同様に飽和型キネティックスに従って輸送されることを実証した。
- ③ PepT 1 のコード領域に対するアンチセンス DNA 処理によって、ラット及びウサギ小腸由来 poly(A)⁺ RNA による PepT 1 の発現がオリゴペプチド及び β -ラクタム抗生物質の輸送をほぼ完全に抑制されたことから、PepT 1 は β -ラクタム抗生物質の消化管吸収に支配的な役割を演じていることが示された。
- ④ PepT 1 安定発現 HeLa 細胞を移植したヌードマウスにジペプチドを効率よく targeting できることを実証した。また、数種の腫瘍細胞にオリゴペプチドトランスポーターが発現していることを発見し、腫瘍細胞移植実験によってジペプチドを腫瘍組織選択的に targeting できることを示した。

以上の研究成果は、オリゴペプチドトランスポーターの構造認識・輸送特性に基づいた薬物経口デリバリー研究に貢献するばかりでなく、薬物を組織選択的にデリバリーする道を開くなど薬物動態領域に重要な知見を与えるものであり、博士(薬学)論文に値すると認める。